

进行组织培养和繁殖的 基本材料与设备

粮 农 组 织

植物生产和保护

文 集

60



联合国

粮食及农业组织

65.62
06
15

进行组织培养和繁殖的 基本材料与设备

作者:

L.A. 威瑟斯

(英国诺丁汉大学农学院)

粮农组织
植物生产和保护
文集
60



联合国
粮食及农业组织

前 言

优质的种植材料是农业和园艺业的基础投入之一，它能大大改善作物的品质 and 生产力。近几十年间，已经研究出一些植物组织培养繁殖法，使若干种作物得以快速繁殖，并且在许多情况下获得无病植株。要成功地进行植物组织培养工作，需要有特殊的设施和装置。为了帮助适用技术的传播，粮农组织已着手一项种子改良和开发计划（SIDP），以制订各种技术准则。

1984年7月3日至4日在挪威 埃思国家种子检测站举行的题为植物组织培养技术和应用（FAO/Norway）专题讨论会，是这项计划的开端。来自世界27个国家的43位代表全面回顾了组织培养技术的范围和可能性，并特别讨论了某些根类作物、棕榈、柑桔和观赏植物的这些技术，还确定了对组织培养繁殖材料容器的最低要求。

本册编写提纲以Lyndsey A. withers博士的题为《受纳和维持组织培养繁殖材料之最低要求》这篇论文为基础写成的，作者根据本次会议上的有关讨论对原论文作了修改。文章力求详细说明一个从事培养物增殖和进行培养的实验室，所需的起码的设备和要求，以求用于培养基制备、清洗、检查培养物、活体培养物的转移、贮存器具和保存记录所需的设备。

此纲要为从事微体繁殖工作的人员准备的，有详细的图解，以及有关特殊操作、辅助技术、保健和安全等设备的细节的附录。参考书目对专家和学生也很有用。

粮农组织衷心感谢协力制订本纲要的全体人员，特别是挪威政府对此的关心与支持，和对组织本届植物组织培养技术及应用（FAO/Norway）专题讨论会 所给予的财政支持。

本书原版为联合国粮农组织的植物生产和保护文集 (60) 《组织培养和繁殖的基本材料与设备》 (FAO Plant Production and Protection paper No. 60, Minimum requirements for receiving and maintaining tissue culture propagating material, M-12, ISBN 92-5-102167-8, 1985.)

本书中所用名称及材料的编写方式并不意味着联合国粮农组织对于任何国家、领地、城市或地区或其当局的法律地位或对于其边界的划分表示任何意见。使用“发达经济”和“发展中经济”这两个词是出于统计上的方便，并不是对某个国家或地区在发展过程中已达到的发展阶段作出的判断。

组织培养和繁殖的基本材料与设备

联合国粮农组织

CPP/90/12

版权所有。未经版权所有者事前许可，不得以电子、机械、照相复制等任何方法或其他程序全部或部分翻印本书，或将其存入检索体系，或发送他人。申请这种许可应写信给联合国粮农组织出版司司长（意大利罗马 Via delle Terme di Caracalla, 00100）并说明希望翻印的目的和份数。

©粮农组织 中文版 1990年 北京印刷

ISBN 92-5-102167-8/CH

目 录

页 次

前言

1. 引言.....	(1)
2. 组织培养原理.....	(1)
2.1 无 菌 操 作.....	(1)
2.2 环 境 的 控 制.....	(2)
2.3 工 作 的 精 确 性 和 文 字 记 录	(2)
2.4 经 济 问 题.....	(2)
3. 实验室设备.....	(3)
3.1 提供清洁有效的工作环境	(3)
3.2 清 洗	(3)
3.3 培养基的制备和贮存	(3)
3.4 培养物的接种和转移	(4)
3.5 植物材料的培养	(5)
3.6 培 养 物 的 检 查.....	(6)
3.7 活 体 转 移.....	(6)
3.8 工 作 室.....	(6)
3.9 物 资 贮 备.....	(6)
3.10 辅助性技术.....	(7)
4. 参考文献.....	(7)
附录:	
I. 组织培养实验室: 设备清单.....	(9)
II. 辅助性技术: 主要装备.....	(13)
III. 保健和 安全.....	(14)
附图 1—23	(16)

1. 引言

在农业和园艺中用于优良基因型无性系繁殖的组织培养法已很好地建立起来。而在清除病原物、遗传操作、基因保存，特别是种质的获得和分配等方法的发展中，（体外）组织培养技术的作用愈发显得重要了。与此同时，人们也越来越强烈地希望举办各种国际性培训班，传授组织培养技术及其在发展中国家的推广。

组织培养所需的设备，论精密、规模和花费，都可说是尽了科学家想象力之所及。不过，本文的宗旨是要说明“最低要求”，并试图同时考虑关于仪器设备的现行标准，以及科学家对一般培训和专业需求。此外，对以培养物为代表的植物种质，以及为保持它们应付出的努力这两者的价值，也从经济学和花费两方面给与了充分估计。

下面一些建议是根据作者在四个十分不同但有同样功效的实验室的工作经验提出的。没有什么理想的实验室设计，不过，某些原则还是应当遵从的（见第二节），有多种令人满意的方法以开展各种各样的工作。为此，本文中的一些细节采用图示说明，而不是文字定义。

对想要建立组织培养实验室的任何人，我们希望他：（1）结合讨论中得到的启发，最好参观一下其他科学家的实验室，来评价我们的以及其他已发表的各种设计（Anon, 1982; Bhojwani和Radzan, 1983; Biondi和Thorpe, 1981; Brown和Thorpe, 1984; Butenko, 1968; de Fossard, 1976; Street, 1977b; Wetherell, 1982; White, 1963），（2）要充分考虑现有设备的良好利用；（3）一些国内产品适合作为本文推荐设备的代用品，要注意发挥其优点，这一点特别重要；（4）要注意根据当地条件得出自己独特的经验，以改进作者所提的建议。

本文没有提供详细的组培方法。关于各种作物的这些方法和特殊要求，请参阅有关的出版物（Anon, 1983; Conger, 1981; Evans等, 1983; Fujiwara, 1982; George, 1984; Rao, 1982; Reinert和Yeoman, 1982; Sharp等, 1984; Street, 1977a; Wheelans和Withers, 1985; 还有一些最早的研究论文）。

通过国际植物组织培养协会（IAPTC），可以同各国的科学家的工作建立联系，该协会在多数国家都有相应的组织，并定期出版通讯。协会的现任秘书是J.M. Widholm博士（伊利诺大学农艺系，厄巴纳-香潘，伊利诺州，61801，美国）。1986年后也可经由本文作者得到有关协会的材料。此外，从IBPGR体外培养信息调研处（见Anon, 1983; Wheelans和Withers, 1985）可以获取有关在某个地区工作的科学家情况或某种作物和技术的信息。

以下各节详细描述与实验室设计、维护和进行有关组培原则，然后是此项工作各个方面所需设备的图示。附录I中就每个工作方面的固定设备、大型或小件仪器和消耗品各项开了一个清单（见第9页）。

2. 组织培养原理

2.1 无菌操作

组培包括植物材料的切段及其后在半固体或液体培养基上的离体培养。典型的培养基含

有丰富的矿物盐、碳和氮源、维生素和生长调节剂。由于这类培养基也同样有利于真菌和细菌的活跃生长,并可能迅速压过培养的植物组织,所以,在培养过程的各个阶段,必须注意防止污染。就是说,培养材料、培养基以及与样本和培养基接触的容器和装置都必须无菌(按微生物学定义)。

为了防止空气中真菌和细菌孢子等进入,必须在特别的接种橱或室中进行操作。应在洁净的环境里保温培养,因为培养器具不能完全阻止微生物的侵染。在共用的实验室里要达到适合的洁净度标准可能有困难。如果实验室是共用的,或是工作场所与植物病理学、微生物学和农艺学经常性工作很靠近,将会出现一些特别问题。第3.1节至3.5节和附录Ⅲ的内容就是关于实验室洁净度方面的。

2.2 环境的控制

研究人员除保证被培养植物的营养外,还要控制培养的物理环境。这包括保持稳定的温、湿度和适当光照和通气条件。此外,要有能将离体培养植株转移到缺少扶助条件的田间或温室中时的设备(见3.5和3.7节)。

2.3 工作的精确性和文字记录

所有的组织培养工作都希望有高度的可重复性。它要求各种试剂的配制要准确,各种准备工作要有详细记录,各个培养物有准确和足够细致的标志,并保存好培养记录(参见3.8节)。与培养有关的情况应包括病情指数、培养史、培养的要求、分类细目以及诸如生化标记等其它“品系方面的资料”。

2.4 经济问题

有关组培条件需求方面的某些评论特别强调经济以及使用简易接种间,和不用一次性用品等等。所有这些都值得考虑,而且肯定会减免某些花费。但是作者认为,这种尺度可能太苛刻,而体忽略了工作人员操作时所用的工时。考虑到在清洗和消毒方面的花费,使用一次性的容器还是便宜的。同样,采用不良的接种条件也没什么好处,必须有更严格的无菌措施(虽有碍工作效率),而这又仅仅是因为如此工作是可能的,从事组培的科学家不得不在这种条件下工作!

解决的办法也许是根据当地条件和花费。将一次性的和可反复用的器具结合起来使用。譬如在我们的实验室,通常用预消毒的塑料培养皿培养各种原始材料,在一些不用塑料制品的场合,少量高质玻璃皿可反复使用多次。假使要求的体积不精确,就用便宜的玻璃吸管来转移溶液或细胞悬液,而不必用有刻度的一次性塑料移液管(见图10)。在非无菌移液时,一次性针管和吸管可以在用第一次之后再使用几次。

关于经济的考虑,还包括对玻璃培养器具的选择。碱质玻璃的成本只是硅酸硼玻璃的几分之一,但使用几次之后可能产生毒性。但是与其选用后者或一次性器皿,不如用碱质玻璃制品,因为它在使用一年以后可用二甲基二氯硅烷处理(Brown和Thorpe, 1984; de Fossard, 1976; de Fossard和Borwne, 1977),即使丢弃,成本也仍划算。批量购买和使用廉价食品瓶这类器具(见图9)能大大减少费用。细心标记培养基可以避免处理可疑的、无法鉴别的原种材料,从而减少培养基、器具和时间的浪费(参见3.3节)

不用分析级的而使用低等级药品,例如从超级市场买的蔗糖,可能降低成本(参见3.2)。采用代用品应当慎重,并且要检测培养有无不良反应。

器材和消耗品的供应随地区而不同。有一组参考资料列出了全世界的供应商 (Bhojwani和Radwan, 1983; Biondi和Thorpe, 1981; Brown和Thorpe, 1984; Chandler和Haque, 1984; Reinert和Yeoman, 1982; 及Wetherell, 1982)。

3. 实验室设备

3.1 提供洁净有效的工作环境

就整个实验室来说, 高标准的清洁度应按以下正规的清洁程序来保证, 包括真空吸尘以保持最低尘量。象冷冻部位出现的持续潮湿表面应予消除, 因为此处容易滋生真菌。实验室在设计上要特别注意保持清洁度。房门应严丝合缝, 最好是滑动门。墙壁和天花板的面应当光滑, 便于清洗, 墙与天花板连接处要密封或呈曲线形。工作台面也应光滑, 用密实的木料或胶合板 (如“Formica”)制作。各种设备的位置要布局合理, 要尽量缩短培养接种及保温培养区与其它工作区之间的距离, 这会减少灰尘和污染物的数量。

对组织培养的植物材料的处理自然有一套过程, 实验室中对每一步过程可按下面的说明安排。一个理想的实验室最好是套间式房子, 每一间用于某一方面的工作。不过, 实际上可能有两个区, 一个是综合实验区, 另一个是培养物存放区。无论操作的规模有多大, 在计划阶段, 对每项任务的筹备和不同程序之间的隔离, 都应细致认真。例如, 为防止去污剂污染培养基, 洗涤和培养基制备这两道工序不应在相邻地方进行。

3.2 清洗

至少需要两个有冷、热水供应的大型水槽和一个高级水源。这个水源最好是玻璃或其它无毒材料 (不能用铜材) 制的蒸馏器的重蒸水。安装一副双出口 (分别通向蒸馏器和洗槽) 的去离子器, 可以提高蒸馏效率, 并提供足够一些清洗用的中级水。此外, 利用离子交换过程能够产生与三次重蒸水质量相当的水 (参见Biondi和Thorpe, 1981)。用有盖的玻璃或塑料容器 (如原来盛酸的大瓶) 来贮存适量的高级水是很方便的, 但不能贮存过长时间, 以免发生微生物和藻类的污染。容器应定期清洗。

塑料盆和有盖的金属或塑桶在清洗工作中应是必备的。清洗的程序是在去污液中浸泡、刷洗、用自来水和重蒸水冲洗, 然后在搁物架上滴水, 并在放入防尘柜里前将其在热气室中烘干。许多常规的清洗工作可以采用自动洗涤机 (要合乎实验室标准, 非家用的) 进行, 但有些清洗总得用手工。

在清洗区应有些家什盛装丢弃的植物材料、无机废水和碎玻璃。受污染的废物和培养物在丢弃之前要蒸汽高压消毒, 要消毒的东西最好放在原来器皿中, 或装在废袋中并放在金属桶里 (参见3.6节)。这样做, 可以使实验室中的空气污染和表面污染得到某些控制。

3.3 培养基的制备和贮存

培养基可以用最高级 (最好是分析级, 参见2.4节) 的化学药品制备, 也可用市售现成的混合料来制作 (de Fossard, 1976; Gamborg, 1984; Reinert和Yeoman, 1982; Streeter和Shillito, 1977; 其它的关于组织培养的教科书和原始研究报告)。多数实验室, 至少某些培养基是用前一种方法制作的。培养基制备区应留有存放化学药品的空间 (开放架或柜橱) 和放置贮存标准的实验室玻璃制品的柜橱。有些药品需要存放在冰箱、低温冷冻柜

(-20℃) 和干燥器这类特殊条件下。

把培养基成分按10倍或100倍的浓度配成母液;装瓶存在低温室或冰箱(图1),是方便作法。维生素的浓缩液可配成可平分的整数(如10ml)体积,装入小塑料瓶,存在低温冰箱。诸如椰子乳这类有机成分也可这样作。蔗糖和琼脂最好按每批培养基用量称出。应备有分析天平和粗天平(图2和图3)。一般认为,这些仪器应在近处而不是放置在培养基制备区内(Bhojwani和Radzan, 1983)。其它基本设备是一台磁力搅拌-加热器(图4),一只温度计和一台pH计(图5)。

配制培养基时使用查对表可保证配制准确(图6)。配好的培养基,通常要用121℃、至少15分钟的高压蒸汽灭菌。培养基可以装在大容器中消毒,以后分装;也可以分加在培养容器中消毒。如果分加在培养容器中灭菌,容器必须是耐蒸汽高压的塑料或玻璃制品(参见Biondi和Thorpe, 1981)。选择什么容器取决于货源、经济状况、使用习惯和培养方式(见图9)。可以配备昂贵的自动分装器,不过,用罐子或自动移液管分装培养基也能取得满意效果(见图7和10)。

输导培养基的软管放在篮子或烧瓶和广口瓶中,置于托盘上去消毒。消毒袋如果用,在消毒时应敞开口,以便蒸汽进去。选择高压消毒器要考虑制作的培养基体积和个别器具的尺寸(图11和12)。选用前口装料的高压消毒器比较好,它具有快、慢降温两个性能。家用高压锅也可使用,但是除了几个烧瓶外,容纳不下更多东西,而且对某些器具来说(例如自动移液管),这种锅也太小。不过,对处理小物件和作为应急,还是有用的。除安全检查外,还要用指示管定期监测灭菌状况(参见附录Ⅲ)。

有些培养基组分(例如生长调节剂吲哚乙酸和赤霉素GA₃)不能经受高压灭菌(参见Van Bragt等, 1971。)。它们应通过滤器消毒(0.2~0.4微米的孔径),然后加到灭菌的成批培养基中。假使是液体培养基,这个操作可在冷却后的任何时候进行。半固体培养基在冷却至40℃左右时放在同样温度的水浴里进行补加操作。用注射器和无菌滤器装置能处理小体积培养基,但是大体积和批量的对热不稳定的液体培养基需用较大的滤器装置进行抽滤或真空过滤(图10)。

用具和玻璃器皿可以用蒸汽高压灭菌,或在烤箱里(160~180℃, 1.5~2小时)干热灭菌。湿热灭菌时,物件适当包在铝箔或高压锅覆盖膜中,若是干热灭菌,则包在纸里、铝箔或金属罐中。

大量贮存培养基是不适当,也是不必要的。不过为方便起见,可在低温室或冰箱中贮备2至4个星期用的适量培养基。一定要仔细贴上培养基的标签和日期(参见图1和8)。

3.4 培养物的接种和转移

培养物接种操作要求最高标准的环境洁净度。有压缩过滤空气流通的工作台是不可缺少的(一种超净工作台,图13)。临时的简易接种间(参见de Fossard和Bourne, 1977)作为辅助设施可能有用,但在现代实验室里不能只有它。工作台应放在实验室的洁净区,远离门窗、加热器通风口等。在热带和一些其它地区,尘埃可能造成问题,理想的作法是把工作台放在一个套间(即接种间),以便减少空气灰尘量,也能延长空气过滤器寿命。可能需要空调器,窗帘以及在接种区安装双层滑动门都有助于保持洁净度。

应使用手提旋叶式风速仪定期监测工作台中的空气流速。用含微生物培养基的培养皿敞

盖接触气流，来定期作无菌测定，可以发现因不畅气流（和气旋涡）或滤器穿孔而引起的不良状况。应有备用滤器和预滤装置，以在需要时及时替换。多数工作台的预滤器能用吸尘或洗涤处理加以清洁。应注意制造厂家提供的有关空气滤器的维修方法。

可以安装一间带空气滤器的小房作为接种间，它应当有光滑易清洗的壁和工作台，墙壁和天花板的连接处最好成曲线形，以便清理。

接种区应有良好的照明、电和煤气供应（天然气或液化气，但不能用煤火）。接种台旁边应设有放工作服和手套等的柜橱，以及洗水槽。

为保证培养物无菌所需要的一般和特殊预防措施随地区而不同。例如，在某个实验室，只要随时穿着干净的工作服就行，不一定考虑用高压消毒大褂、帽子和口罩以及一次性手套（图14）；但在另一个实验室，这些却是必需的（请注意：一次性手套可以保护过敏性皮肤免受酒精和别的消毒剂的损伤）。同样地，在培养时麻烦特别多的地方（但不是多数地区），在培养物接种区和培养区、甚至在整个实验区穿套鞋是必要的。不过，通常有助于清洁和整齐的作法，总是可取的（如图15和16）。

培养物分离、接种和转移需用一套器具，包括镊子、刮刀、注射针和剪刀，都应是不锈钢或镍制的（图17）。一些一次性用具也是有用的（图17）。特别精细的工作可能需要一些诸如皮肤钩和锋利手术刀等外科用具，可用一段剃须刀片或缝衣针制作带手柄的用具。还应备有酒精消毒液、酒精灯或煤气灯和酒精洗瓶。

有些剥离操作要用立体显微镜（图18和19）。应选用容易保持洁的净显微镜，有良好的放大率（ $\times 8$ 至 $\times 50$ 的变焦镜头），以及良好的工作距离（即100毫米）。显微镜应有足够的光源；纤维光源特别有用。

3.5 植物材料的培养

培养物可以被培养在适合的特定房间里，或室内套间或培养箱内，当需要多种条件的场合，后者可能更好、更有效。可是应确保小培养室对培养物是适合的。原来一些培养室是为盆栽植株设计的，对多层放置的培养物来说，光线肯定不足。

培养室内温度要很好地控制在 20°C ~ 30°C 之间，要有断热装置、指示灯和电铃，它们的灵敏度应在 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ~ 3°C 。温、湿度自动记录仪有助于监测环境的控制情况，及早查明所出现的问题。最好有备用的发电机或其它供电设备，带有一个自动启动开关。在多数气候带，除加热器外，冷冻设备是需要的，以维持理想的温度。

为了避免例如光源附近的空气过热，应有良好（但要轻缓）的空气循环。为此可能需要安装风扇。通向培养室的空气应尽可能纯净，不带有化学烟气。所以，送气口要远离烟橱排气管等。在培养室内保持稍高的空气正压有助于排尘。

液体培养要晃动，以保证通气，这就要有摇床或其它合用的设备。如是静止培养（培养皿浅盘或架上的培养管等），应放在层架上。相对便宜的钢架很容易加以改装和利用。图中的这个实验已经安置这种层架，在每一层架下方或培养室壁的垂直方向装着荧光灯（见图20和21）。

单有白炽灯在光谱质量上是不适合的，而且产热太多。荧光灯镇流器可能产生过多的热，因此应安在培养室外。通常适合的光照度是1000~4000勒克斯（lx）。在特殊情况下，譬如在转入盆栽之前，使植株幼苗健化，可能需要10000~12000 lx（参见3.7节）。暗培养可

以在同一房间中隔开区进行,或把培养物封在由暗室窗帘布制成的袋子中。

用定时电开关能造成交替的光照和黑暗条件。通常用的是16小时白昼/8小时夜晚这种周期,有时,白昼的室温要高些。各种作物的光照要求应查阅参考书(可参阅Wetherell, 1982)。

培养室相对湿度应达到70%。太高的湿度会使容器内潮湿和引起污染。湿度过低将使培养基很快发干。

培养区应尽可能保持清洁,已被污染的培养物应立即移走(见3.6节)。如果培养设备靠近土壤处理区,可能需要喷药以控制螨类侵染。在组培过程中,一些培养物在进一步处理之前需要证明无病原菌或无特殊的微生物污染,做这项工作应有隔离区、隔离间或小室。为避免交叉污染,处理材料时应采取最严格的无菌措施。

3.6 培养物的检查

定时观察培养物是必要的。这可以在培养室里进行,需要有适用的桌子、椅子和立体显微镜。检查工作也可在超净工作台内进行。如果培养容器需要打开做仔细检查,就必须用操作台。对正在培养的培养物作随机检查时,准备一个手持放大镜是有用的。

要经常检查培养物的污染情况,并除掉可疑的东西。最好把被污染的培养物及时处理掉,但是对特别有价值的培养材料,可用抗生素和杀虫剂处理,以便“挽救”(参见, Wooi, 1984)。不过在一般实际工作中不提倡这样作。

3.7 活体转移

在很多情况下,组培实验室可作为国际交换的种质接收站,或是为以后温室、网室或大田提供植株的无性系繁殖场所。即使一个实验室本身单独从事组培工作,它也能根据组培计划的性质做好活体转移,如定期让植株转入独立生长,以便检查其表现型和繁殖率等。

进行盆栽前,可以通过增加光照和把培养器罩打开几天,使培养的植物适应一下,也可直接把它们移植到培养块、泡沫团粒基质中或装有松软经消毒的有机肥料盆中。植株幼苗健化过程在喷雾繁殖钵中进行(图22),也可用一种廉价的园艺繁殖箱(图23),甚至就扣在大烧杯或塑料袋下进行。后三种情况,有必要逐渐降低湿度,分别打开通气孔,抬高烧杯加大缝隙直至移走烧杯,或是划破塑料袋。

输出的培养物和接种材料要有适当的包装(如聚乙烯塑料箱),并接受各地所需的有关检疫和病情观察(参见 Appelgren, 1984; Kristensen, 1984; Kartha, 1984; Navarro, 1984; Roca等, 1979, 1984; Villalobos, 1984; Withers和Williams, 1985)。Roca等人(1984)介绍了关于木薯体外培养植株的装填、繁殖和盆栽的一个全面计划,可作为其它作物的一个范例。

3.8 工作室

室内应有一张桌子、一把椅子,放卷宗、参考书、纸张和分类目录的柜架和一个计算机,它在配制培养基时也用得着。保留的记录要象第2.3节中说明的那样记载,加上其它一些细目,如药品等级、培养基配方、培养物收发记录、有关的植物保健文件等。

3.9 物资贮备

许多东西,包括一次性器皿和其它消耗品、玻璃器皿和化学药品,都应成批购买,以节省开支。因此要有合适的贮存地方,贮存处应保证物品不变质,不失窃和不受虫兽的糟践。

3.10 辅助性技术

前面各节提出的是对各种组织培养工作的共同要求。还有些技术没有涉及,例如先进的光学显微镜、电子显微镜、照相设备、用于培养物贮存的慢生长和冷冻保存技术、生化分析、疫病的消除和指数确定,以及遗传操作技术。附录II中列出了前五个设备的要求。详细情况应查阅有关专门文献材料(如Evans等,1983;Fujiwara,1982;Ingram和Helgesson,1980;Reinert和Yeoman,1982;Street,1977a;Vasit,1984;Withers,1984a;1984b;以及文中所引用的参考文献)。

4. 参考文献

- Anon, Seed Sources and Tree Improvement. Sabah, Malaysia. Vegetative
1982 propagation; *In vitro* culture. Based upon the work of R. R. B. Leakey, FAO/UNDP-MAL 78/009. Consultant Report No.10, FAO, Rome, P. 37.
- Anon, Information on *in vitro* culture. Plant Genetic Resources
1983 Newsletter, FAO/IBPGR 55, 16.
- Bhojwani, S. S. & Radzan, M. K. Laboratory requirements and general
1983 techniques. *in*. Plant Tissue Culture: theory and practice. S. S. Bhojwani and M. K. Padzan (eds), Elsevier, Amsterdam, p.11-24.
- Biondi, S. & Thorpe, T. A. Requirements for a tissue culture facility.
1981 *In*. plant Tissue culture: methods and applications in agriculture. T. A. Thorpe (ed.), Academic Press, New York, pp.1-20.
- van Bragt, J., Mossel, D. A. A., Pierik, R. L. M. & Veldstra, H.
1971 (eds.) Effects of sterilization on compounds in nutrient media. H. Veerman and Zonen, Wageningen, p.145.
- Butenko, R. G. Plant Tissue Culture and plant morphogenesis. Israel
1968 Programme for Scientific Translations, Jerusalem, pp.291.
- Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. & Yamada, Y.
1983 (eds.), Handbook of plant cell culture: volume I, Propagation and Breeding. Macmillan, New York p. 970.
- de Fossard, R. A. Tissue culture for plant propagators. University of
1976 New England Printery, Armidale, New South Wales, 409p.
- de Fossard, R. A. & Bourn R. A. Reducing tissue culture costs for
1977 commercial propagation. *In*. Tissue culture for horticultural purposes. *Acta Hort.* 78, 37-44.
- Fujiwara, A. (ed.) Plant tissue culture. Maruzen, Tokyo, 839p.
1982
- Ingram, D. S. & Helgesson, J.P. (eds.) Tissue culture methods for plant
1980 pathologists. Blackwell, Scientific Oxford, 272p.

- Reinert, J. and Yeoman, M. M. (eds.) . Plant cell and tissue culture:
198t A Laboratory Manual, Springer, Berlin, 83p.
- Roca, W. M. , Bryan, J. E. & Roca, M.R. Tissue culture for the
1979 international transfer of potato genetic resources. *American Potato Journal* 56 1-10.
- Street, H. E. (ed.) , Plant tissue and cell culture (second edition) .
1977a Botanical Monographs 11, Blackwell, Oxford, 614b.
- Street, H. E. Laboratory organization, *In*. Plant tissue and cell
1977b Culture (second edition) . Botanical Monographs 11, Blackwell
oxford, pp 11-30.
- Street, H. E. & Shillito, R. D. Nutrient media for plant organ, tissue
1977 and cell cultures. *In*. CRC Handbook Series in Nutrition and Food,
Vol. 4, M. Rechcigl Jr. (ed.) , CRC Press, Cleveland, PP.
305-358.
- Vasil, I. K. (ed.) , Cell culture and somatic cell genetics of plants.
1984 I. Academic Press, New York (in press) .
- White, P. R. The cultivation of animal and plant cells. The Ronald
1963 Press, New York, 228p.
- Withers, Lyndsey A. Cryopreservation. *In* Cell culture and somatic
1984 cell genetics of plants. II, I. K. Vasil (ed.) , Academic
Press, New York (in press) .
- Withers, Lyndsey, A. & Williams, J. T. In vitro research for the
1984 long-term storage of plant germplasm and its exchange *In*.
Proceedings of Inter-Center Seminar on IARCs and Biotechnology,
Manila, April 1984 (in press) .

附录 I:

组织培养实验室—设备清单 (结合第 3 节的内容阅读)

1. 基本要求

供电—尽可能有备用的发电和供电设备
管道自来水
煤气供应—最好是天然气
空气调节器—随地区而定
工作台—供坐着和站着操作两种高度的
椅子和凳子
真空压缩空气—大型回流式或轻便空压机
器皿橱
灭火器
急救箱和其它安全器械

2. 清洗

双洗涤槽—大尺寸
冷、热水供应
塑料盆
空水的架子
瓶刷—各种大小
洗涤瓶
热气烘干柜
废物箱
有盖的钢桶或塑料桶
玻璃蒸馏器—最好是重蒸馏的
防水围裙和手套
带盖的玻璃或塑料蒸馏水瓶
一次性手巾箱
去污剂分散器
去污剂、化学消毒剂、肥皂
不锈钢筛或尼龙筛
其它的有用器具
玻璃器皿洗刷机
吸管洗涤器
水质脱离子器

3. 培养基的制备和贮存

药品架
化学毒品柜
溶剂橱
冰箱
低温冷柜
干燥箱
精密天平—精确至0.1毫克
粗天平
盘秤
刮铲：小、中、大型
磁力搅拌和加热器
带缓冲液和校正液的pH计
温度计
锥形瓶：100、250、500毫升、1升、2升
容量瓶：100、250、500毫升、1升
量筒：10、25、50、100、500毫升、1升、2升
烧杯：100、250、500毫升、1升、2升
过滤瓶和漏斗
有管道的注水泵
灌水壺：1升、2升
刻度移液管：1、2、5、10毫升
自动移液管：10、20毫升
套管和双向阀分散器（前面提到的）
巴氏移液管
吸管橡皮头（前面提到的）
移液管加料器
一次性针管：1、10、20毫升及各种针头
膜滤器及架子
培养器皿：管子；长颈瓶；瓶子（按需要而定）
玻璃螺口瓶：250、500毫升、1升
万用瓶
塑料小瓶：10、20毫升
装大瓶用的铁丝筐
手推车
高压消毒锅
隔热手套
铁丝筐
耐高压消毒的盘子

高压消毒器用的覆膜

铝箱

高压消毒锅指示卷纸

一般用途的胶布

防水指示器

洗瓶

废物箱

废物处理袋或消毒袋

一次性手巾箱

贮备性药品（按需要）

滤纸，纸帕等（按需要）

其它有用物品

精密自动移液管

自动培养基分散器

热消毒烤箱

微波炉

水浴

汽热器—用于熔化半固体培养基

标签枪

低温室

低速离心机

防烟面罩—在处理化学药品时必需

压力锅

4. 培养物的接种和转移

超净工作台

解剖器具：解剖刀（大、小型，各种刀片）；刮铲；一些针；镊子（各种大小的：钝端的和锐端的）；剪刀；临时挂勾；外科手术刀和针

放置各种器具的台架

酒精液

洗手消毒液

酒精灯或煤气灯

酒精喷洒器

一次性手巾的挂箱

纸巾

废物箱

有光源（最好有纤维光）的解剖显微镜

实验服、帽子、面罩—（按需要而定）

贮物箱

水槽

一次性手套

防水标签

对接粘纸 (Parafilm)

盘子

5. 培养物的保温培养

可调节温度和湿度的房间或小室

有光源的层架

托盘

试管架

最高和最低温度计

其它有用的器具

温湿度自动记录监测仪

液体培养的附加设备

往复式摇床

装填物或适合玻璃器皿的类似物品

6. 培养物的检查

解剖显微镜

复式显微镜

载玻片、盖玻片

手持放大镜

其它有用的器具

在层流室内称量培养物的电动天平

7. 活体转移

花盆

托盘

植株标签

园艺繁殖箱

烧杯或塑料袋—与要盖的花盆尺寸相配

有机肥或其它适用的底肥

液体肥料

其它有用的器具

喷雾繁殖箱或高湿小室

8. 工作室

桌子

椅子

档案柜

书架